Untersuchungen über Sekundärreaktionen bei der Einwirkung von Phenoloxydase auf Catechine.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Freien Universität Berlin

überreicht von

Otfried Linde

aus Sandersleben

1961

Untersuchungen über Sekundärreaktionen bei der Einwirkung von Phenoloxydase auf Catechine.

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Freien Universität Berlin

überreicht von
Otfried Linde
aus Sandersleben

1961

1. Berichterstatter: Prof. Dr. G. S C H E N C K

2. Berichterstatter: Prof. Dr. N. K R E U T Z K A M P

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Tag der mündlichen Prüfung: 8. Juni 1961

Tag der Promotion: - 9. Dez. 1961

Die vorliegende Arbeit wurde am Pharmazeutischen Institut der Freien Universität Berlin angefertigt.

Herrn Professor Dr.G.SCHENCK danke ich aufrichtig für die Überlassung des Themas und für sein mir jederzeit entgegengebrachtes Interesse an meiner fachlichen und menschlichen Entwicklung.

An dieser Stelle sei mir erlaubt, Herrn Priv.-Doz.Dr.K.-H.FRÖMMING meinen Dank für seine Unterstützung bei der praktischen Durchführung der Arbeit und beim Literaturstudium zu sagen.

Der Fa. SCHERING AG bin ich für die Aufbereitung der Fermentpräparationen mittels Gefriertrocknung zu Dank verpflichtet.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
A.	Einleitung	5
B.	Problemstellung	9
C.	Experimenteller Teil	12
1.	Fermentgewinnung und Bestimmung der Fermentaktivität	12
2.	Die Oxydation von D-Catechin und L-Epicatechin	14
a.	Die fermentative Oxydation durch Phenoloxydase	14
b.	Die Entstehung von Kohlendioxyd bei der fermentativen Oxydation	16
c.	Die Bestimmung der Autoxydation	18
d.	Die Fermentinaktivierung durch Reaktionsprodukte	20
3.	Sekundärreaktionen von fermentativ oxydiertem D-Catechin und L-Epicatechin	21
a.	Sekundärreaktionen mit Ascorbinsäure	21
b.	Sekundärreaktionen mit Rutin	25
c.	Sekundärreaktionen mit Hydrochinon	28
d.	Sekundärreaktionen mit Gallussäure	32
e.	Sekundärreaktionen mit α-und ß-Naphthol	34

Seite

4. Die fermentative Oxydation von Catechin/Coffein-Gemischen 37

5. Die Einwirkung von Catechinen auf die fermentative Oxydation von Cresolen 49

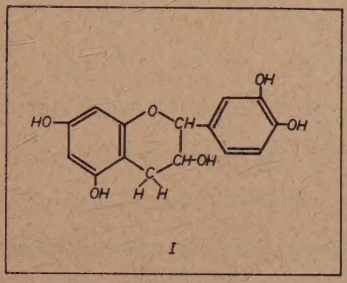
6. Die Einwirkung von Catechin auf die fermentative Oxydation von Nordihydroguajaretsäure 54

D. Zusammenfassung 57

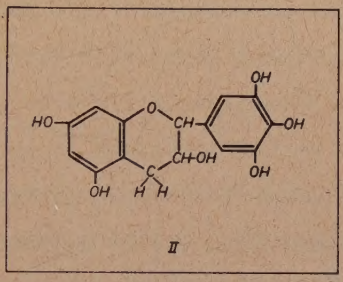
E. Literaturverzeichnis 60

A. Einleitung

Catechine und Catechinderivate sind im Pflanzenreich weit verbreitete Verbindungen (1). Am häufigsten findet man das L-Epicatechin, das D-Catechin (I) und das Gallocatechin (II).



I



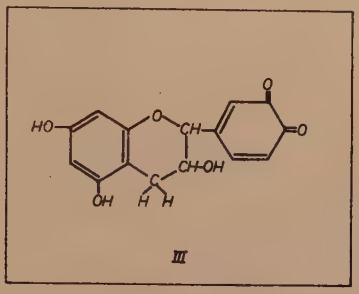
II

Im L-Epicatechin liegt das cis-Isomere vor, während das D-Catechin die trans-Form des 3,5,7,3',4'-Pentahydroxyflavans darstellt (1). Die weite Verbreitung hat zur Folge, daß auch viele unserer Nahrungs-, Genuß- und Heilpflanzen Catechine enthalten.

Eine große Bedeutung kommt den Catechinen dadurch zu, daß sie als Ausgangsprodukte für die Bildung der Catechin-Gerbstoffe anzusehen sind. Nach FREUDENBERG bilden sich diese durch Polykondensation unter Einwirkung von Feuchtigkeit und Säure oder auf fermentativem Wege (2). Ein Ferment, das imstande ist, fermentativ Gerbstoffe zu bilden, stellt die Phenoloxydase dar. Derartige fermentative Prozesse können relativ schnell ablaufen, sofern bei dem

Oxydationsvorgang optimale Bedingungen in Bezug auf Feuchtigkeit, Temperatur und Fermentationsdauer herrschen.
Die Phenoloxydase, die nach dem augenblicklichen Sprachgebrauch auch als Polyphenoloxydase oder Tyrosinase bezeichnet wird, ist ein im Pflanzenreich weit verbreitetes Ferment, dessen Wirkung erstmalig von BOURQUELOT und BERTRAND beschrieben wurde (3). Als Substrat wurde von BERTRAND die phenolische Aminosäure Tyrosin erkannt, womit sich der Name "Tyrosinase" erklärt. Das kupferhaltige Proteid gehört zu der wichtigen Gruppe der Redoxasen oder Oxydoreduktasen. In ein reversibles Redoxsystem, welches von einem Wasserstoff-Acceptor spontan oxydiert und von einem Wasserstoff-Donator reduziert werden kann, ist die Phenoloxydase als Überträger zwischen Acceptor und Donator eingeschaltet, wenn auch noch nicht geklärt ist, ob das Ferment eine Bedeutung in der Atmungskette der Pflanzen hat. Im Gegensatz zu vielen Fermenten, die sich durch eine sehr eng begrenzte Substratspezifität auszeichnen, stehen der Phenoloxydase Mono-, Di- und Polyphenole als Substrate zur Verfügung. Als wichtige, natürlich vorkommende Verbindungen, die von dem Ferment oxydiert werden können, sind zu nennen: p-Oxyzimtsäure, Chlorogensäure, Kaffeesäure, Brenzkatechin, Catechine, Gallussäure u.a.
Eingehender sind z.B. die Wechselbeziehungen zwischen der Phenoloxydase und den Catechinen bei der Fermentation des Tees und des Tabaks untersucht. Hierbei findet eine Zerstörung der pflanzlichen Zellen statt, was zur

Folge hat, daß die Phenoloxydase und die Catechine miteinander in Reaktion treten können. Das erste Reaktionsprodukt bilden die entsprechenden Catechin-Chinone (III).



III

Diese Chinone kondensieren dann zu di-oder trimeren Verbindungen. Über die Art der Bindung dieser Catechin-Chinon-Einheiten herrscht bis heute jedoch noch keine Klarheit. Hauptsächlich sind es die Arbeitskreise um KURSSANOW (4), HATHWAY (5) und ROBERTS (6), die sich mit diesem Problem befaßt haben. In den natürlich vorkommenden kondensierten Gerbstoffen liegen Gemische verschiedener Kondensationsgrade vor.

Die Reaktionen der fermentativ gebildeten Catechin-Chinone brauchen sich jedoch nicht nur auf eine Kondensation von Chinon-Einheiten untereinander zu beschränken. Vielmehr können diese Chinone auch mit chemisch anders gebauten Partnern reagieren. Die Reaktionen beruhen auf der Eigenschaft der Chinone, auf Kosten anderer Verbindungen wieder zu Polyphenolen reduziert werden zu können. In diesen Fällen spricht man von einer Ü b e r t r ä g e r r e a k t i o n, da durch diese Überträgerwirkung

des Chinons andere Verbindungen, die von dem Enzym selbst nicht angegriffen werden, enzymatisch oxydiert werden können. So fand KUBOWITZ, daß Ascorbinsäure von der Phenoloxydase allein nicht oxydiert wird, sondern nur bei Anwesenheit von Brenzkatechin. Das fermentativ gebildete o-Benzochinon oxydiert auf nichtfermentativem Wege die Ascorbinsäure zur Dehydroascorbinsäure (7). JAKSON (8), sowie WAGREICH und NELSON (9) zeigten einen anderen Typ von Überträgerreaktionen. Sie reduzierten fermentativ gebildete o-Chinone mittels Anilin und erhielten Mono- und Di-Anilophenole bzw. Anilochinone. Ähnliche Reaktionen laufen u.a. auch bei der Teefermentation ab, wobei z.B. Ascorbinsäure, Aminosäuren oder Eiweiße mit den Chinonen reagieren können (10).

B. P r o b l e m s t e l l u n g

Die sekundären Wirkungen, die durch die Phenoloxydase in Anwesenheit phenolischer Überträger ausgeübt werden, können auch im pharmazeutischen Bereich von Bedeutung werden. Verschiedene arzneilich verwendete Pflanzen enthalten Phenoloxydasen und Catechine. Bei der Ernte bzw. bei der weiteren Verarbeitung der Arzneipflanzen können Ferment und Substrat miteinander reagieren. Es ist nicht ausgeschlossen, daß die in erster Reaktionsstufe entstehenden Chinone ihrerseits mit anderen Verbindungen in Wechselwirkung treten. Solche Verbindungen können therapeutisch wertvolle Inhaltsstoffe sein, so daß auf diese Weise eine Wertminderung der Droge oder Arzneizubereitung eintreten kann.

Um einen näheren Einblick in den Ablauf solcher Reaktionen zu erhalten, sollte die Möglichkeit einer Überträgerwirkung in vitro auf einige Stoffe untersucht werden. Hierzu wurden insbesondere solche Verbindungen herangezogen, die gemeinsam mit Catechinen in Pflanzen vorkommen oder in pharmazeutischen Zubereitungen gemeinsam anzutreffen sind, wie z.B. das Coffein, die Ascorbinsäure, die Nordihydroguajaretsäure, die Gallussäure oder das Rutin.

Ein besonderen Interesse ergab sich aus etwaigen Wechsel-

wirkungen des Coffeins mit dem System Phenoloxydase/Catechin.

Einige Angaben in der Literatur schienen eine nähere Untersuchung zu rechtfertigen. ZLATAROFF und POPPOFF (11) stellten fest, daß Coffein die Fermente Pepsin, Trypsin und Oxydase in ihrer Aktivität steigert, ohne dabei nähere Angaben über die Art der Oxydase zu machen. Sie bedienten sich dabei relativ grober kolorimetrischer Methoden, indem sie die Intensitäten der Braunfärbungen gegeneinander schätzten, die durch Einwirkung der Oxydase auf phenolische Substrate mit und ohne Coffein entstanden. Sie stellten eine intensivere Braunfärbung bei den Ansätzen mit Coffein fest. Uns stehen heute exaktere Methoden zur Verfügung, die es ermöglichen, diese Erscheinung manometrisch und spektrophotometrisch zu verfolgen.

Nach KOZOI (12) verändert sich Coffein während der Fermentation von Tee, wobei der Coffeingehalt bis zu 50% abnehmen soll. Aus neueren Veröffentlichungen geht hervor, daß sich bei der Fermentation nur das Verhältnis von an Catechin gebundenem zu freiem Coffein ändert (13).

Ein französisches Patent aus dem Jahre 1942 (14) empfiehlt zur Entcoffeinisierung von Tee, Kaffee und Kakao die Zugabe von Oxydase bei der Aufbereitung des Pflanzenmaterials.

BIEHL (15) findet eine Abnahme von stickstoffhaltigen Substanzen bei der Fermentation von Kakao. Diese Erscheinung wird zum Teil damit erklärt, daß durch Zellaufbruch austretendes Wasser wasserlösliche Substanzen dem Fermentationsgut entzieht.

Es erhob sich also die Frage, ob das Coffein durch Vermittlung des Systems Phenoloxydase/Catechin oxydiert werden kann.

Es war nicht möglich, außer D-Catechin und L-Epicatechin andere Catechinderivate zu diesen Untersuchungen heranzuziehen, da die zur Gewinnung benötigten Grundstoffe, wie z.B. frischer grüner Tee, nicht in ausreichenden Mengen zur Verfügung standen.

C. Experimenteller Teil

1. Fermentgewinnung und Bestimmung der Fermentaktivität.

Die Kartoffelsorte "Ackersegen" diente als Ausgangsmaterial für die Gewinnung der Phenoloxydase. Die Aufbereitung erfolgte im wesentlichen nach einer von KUBOWITZ (16) gegebenen Vorschrift bis zur zweiten Fraktionierung mit Ammonsulfat und anschließender Dialyse. Um Aktivitätsverluste zu vermeiden, wurden die Arbeiten im Kälteraum bei 2°- 4°C durchgeführt und darauf geachtet, daß die Präparationen nicht mit Metallgegenständen in Berührung kamen. Das Zentrifugieren geschah in einer Kühlzentrifuge bei etwa 0°C. Während zu Beginn der Untersuchungen die nach der Dialyse und folgendem Abzentrifugieren erhaltene klare Lösung je nach den Erfordernissen verdünnt und zu den Versuchen herangezogen wurde, erfolgte im weiteren Verlauf eine Trocknung durch Lyophilisation. Der Fermentrückstand besteht dann aus einer gelblich-weißen Präparation, von der jeweils vor dem Versuchsansatz die erforderliche Menge in bidestilliertem Wasser aufgelöst wurde. 1 ml Fermentlösung ergab 4,5 mg Trockenrückstand. 15 kg Kartoffeln ergaben nach der erwähnten Vorschrift 1,8 g Trockenferment. Durch die Gefiertrocknung wird die Haltbarkeit des Fermentes erheblich gesteigert und ein Aktivitätsverlust, wie man ihn in wässriger Lösung bei längerem Lagern

beobachtet, vermieden.

Die Aktivitätsmessungen und die Bestimmungen des Sauerstoffverbrauchs wurden in der WARBURG - Apparatur durchgeführt. Das Ferment befindet sich in den an den Manometergefäßen seitlich angebrachten Birnen und wird nach erfolgtem Temperaturausgleich mit der Reaktionslösung vereinigt. Bei allen Messungen wurde Zitronensäure-Phosphatpuffer nach MC ILVAINE benutzt. Zur Feststellung einer durch Luftdruckschwankungen oder andere Ursachen entstehenden Druckdifferenz liefen bei allen Versuchen zwei Gefäße mit, die außer der Fermentlösung die gleichen Substanzen und Lösungsmittel enthielten wie die Versuchsansätze. Bei der Auswertung der Meßergebnisse wurden diese Werte dann berücksichtigt. Wie aus den Versuchen über die Entstehung von Kohlendioxyd bei der fermentativen Oxydation von Catechinen (Abb.2 und Abb.3) hervorgeht, war es erforderlich, stets mit einem Einsatzgefäß zu arbeiten, das 0,1 ml 10%ige Natronlauge enthielt, um eine Verfälschung der Meßwerte zu vermeiden. Die Aktivität der Fermentpräparationen wurde in Cresolase-Einheiten ausgedrückt. Nach GRAUBARD und NELSON (17) hat die Aktivität 1 Cresolase-Einheit die Fermentmenge, die bei P_H 6,0 und 25°C auf 9,0 mg p-Cresol/5 ml Reaktionsflüssigkeit einwirkt und hierbei eine Sauerstoffaufnahme von 10 cl pro Minute während der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit bewirkt. So ergaben sich für die einzelnen Fermentpräparationen, die im Laufe dieser

Arbeit bereitet wurden, Aktivitäten von 55 bis 60 Cresolase-Einheiten pro ml. Da von jeder Fermentpräparation die Aktivität bestimmt wurde, konnten durch entsprechende Verdünnungen Lösungen gleicher Fermentaktivität hergestellt werden.

2. Die Oxydation von D-Catechin und L-Epicatechin.

2a. Die fermentative Oxydation durch Phenoloxydase.

Für die weiteren Untersuchungen war es zunächst von Interesse, festzustellen, ob im Hinblick auf die Reaktionsgeschwindigkeiten der Oxydation des D-Catechins und des L-Epicatechins allein Unterschiede ermittelt werden konnten. Zum anderen sollte die Einwirkung des Fermentes auf ein Gemisch beider Substrate untersucht werden. Es wurde mit einer verhältnismäßig kleinen Substratkonzentration und einem Überschuß an Ferment gearbeitet, um zu erreichen, daß die Substrate vollständig oxydiert wurden und der Einfluß der später erwähnten Reaktionsinaktivierung klein bleibt.

Abb. 1 zeigt, daß der Sauerstoffverbrauch nach einer Reaktionszeit von 20 Minuten bei der Oxydation von L-Epicatechin unter gleichen Versuchsbedingungen etwa um ein Drittel höher liegt als der des D-Catechins. Nach 20 Minuten waren pro Mol D-Catechin 0,5 Mol Sauerstoff und pro Mol L-Epicatechin 0,75 Mol Sauerstoff verbraucht worden.

Gemeinsame Oxydation der beiden Substrate führte unter den

gewählten Versuchsbedingungen zu einer Addition der Reaktionsgeschwindigkeiten. Hierdurch kann kein Hinweis auf sekundäre Reaktionen erhalten werden.

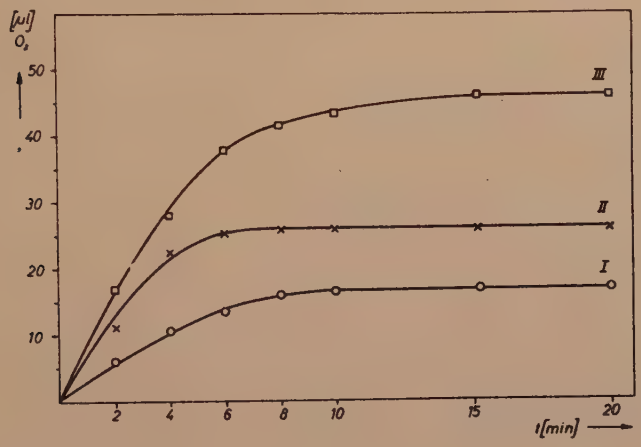


Abb.1: Fermentative Oxydation von D-Catechin, L-Epicatechin und eines Gemisches D-Catechin/L-Epicatechin.
I : 500 γ D-Catechin
II : 500 γ L-Epicatechin
III: I + II
2,0 ml Puffer P_H 6,8; 0,5 ml Ferment (5,3 Cresolase-Einheiten/ml Reaktionslösung); 25°.

Die schnellere Oxydation des L-Epicatechins konnte auch papierchromatographisch festgestellt werden. Hierzu wurden je 2,5 mg beider Catechine in 10,0 ml Puffer P_H 6,8 gelöst und bei 25°C mit einem Überschuß an Ferment versetzt (4,5 Cresolase-Einheiten/ml Reaktionslösung) und

unter steter Luftzufuhr oxydiert. Nach 2,5,10,15,25, 45 Minuten wurden je 0,5 ml entnommen, zu 0,5 ml Methanol zwecks Inhibition des Fermentes gegeben und von dieser Lösung 0,05 ml aufgetragen. Es wurde absteigend mit wassergesättigtem Butanol auf Whatman-Papier Nr. 1 gearbeitet; Temperatur 20°- 23°C. Zum Sichtbarmachen wurde eine 0,5%ige Lösung von diazotierter Sulfanilsäure in 50%igem Methanol verwendet, mit der die Chromatogramme besprüht wurden. Dabei zeigte sich, daß nach 25 Minuten kein L-Epicatechin mehr vorhanden war, während D-Catechin noch sichtbar gemacht werden konnte. Auch beim Auftragen einer zehnfachen Menge Reaktionslösung wurde das gleiche Ergebnis erhalten. Das entsprechende Ergebnis wurde erhalten, als die beiden Catechine in doppelten Konzentrationen unter sonst gleichen Bedingungen einzeln oxydiert wurden.

2b. Die Entstehung von Kohlendioxyd bei der fermentativen Oxydation.

Voraussetzung für die Durchführung der fermentativen Untersuchungen der Catechinoxydation ist eine genaue Kenntnis der Kohlendioxydentwicklung bei den herrschenden Reaktionsbedingungen, da diese bei dem fermentativ bedingten Sauerstoffumsatz berücksichtigt werden müssen. Mehrere Autoren haben bereits Untersuchungen über die CO_2-Bildung mitgeteilt (4,18). Die bei der Reaktion frei werdende Kohlensäure, die sich nicht in

der Flüssigkeit löst und als Gas in den Gasraum des Reaktionsgefäßes gelangt, verfälscht infolge ihres Partialdruckes die manometrisch ermittelten Werte. Aus diesem Grunde befindet sich im Hauptraum der Reaktionsgefäße ein Einsatz, der bei Bedarf mit 0,1 ml 10%iger Natronlauge beschickt werden kann, um die gasförmige Kohlensäure zu binden. Zur Vergrößerung der Oberfläche wird zusätzlich in den Einsatzraum ein Stück Filterpapier gebracht, welches die Lauge aufsaugt.

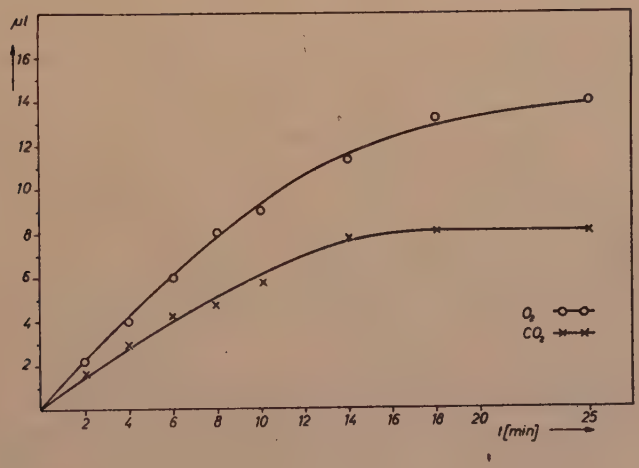


Abb.2: O_2-Verbrauch und CO_2-Entwicklung bei der fermentativen Oxydation von D-Catechin.
5,0 mg D-Catechin; 2,0 ml Puffer P_H 6,8; 0,5 ml Ferment (0,80 Cresolase-Einheiten/ml Reaktionsflüssigkeit); 25°.

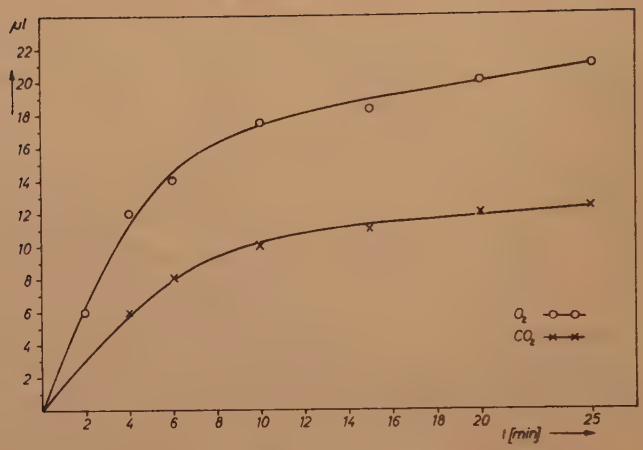


Abb.3: O_2-Verbrauch und CO_2-Entwicklung bei der fermentativen Oxydation von L-Epicatechin.
5,0 mg L-Epicatechin; 2,0 ml Puffer P_H 6,8; 0,5 ml Ferment (0,80 Cresolase-Einheiten/ml Reaktionsflüssigkeit); 25°.

Die in den Abb. 2 und 3 dargestellten Ergebnisse zeigen, daß bei der fermentativen Oxydation von D-Catechin und L-Epicatechin eine Ausscheidung von Kohlendioxyd erfolgt. Das hatte zur Folge, daß bei allen manometrischen Messungen mit Catechinen als Substrat Natronlauge zum Binden des Kohlendioxyds benutzt werden mußte.

2c. Die Bestimmung der Autoxydation.

Entsprechend der Kohlendioxyd-Entstehung mußte bei meinen Versuchen auch die in der Literatur beschriebene Autoxydation bei der Auswertung der manometrischen Meßergebnisse berücksichtigt werden (19).

Abb.4 veranschaulicht die Autoxydation von D-Catechin bei verschiedenen P_H- Werten und verschiedenen Substratkonzentrationen.

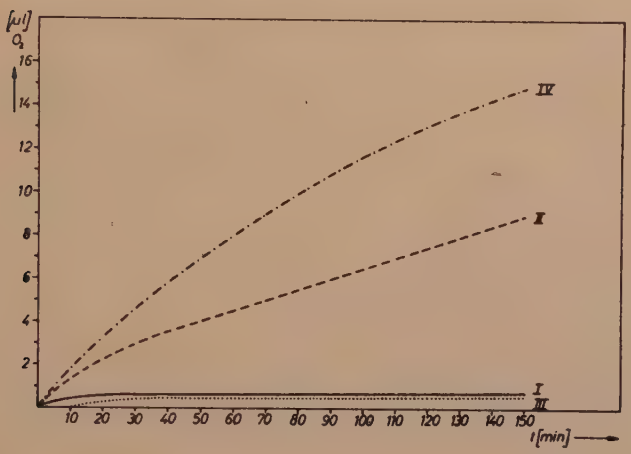


Abb.4: Autoxydation von D-Catechin bei P_H 6,0 und 8,0.
I : 15,0 mg D-Catechin ; P_H 6,0;
II : 15,0 mg D-Catechin ; P_H 8,0;
III: 30,0 mg D-Catechin ; P_H 6,0;
IV : 30,0 mg D-Catechin ; P_H 8,0;
5,0 ml Puffer ; 25°.

Es ist zu ersehen, daß die Autoxydation bei P_H 6,0 in dem gemessenen Zeitraum zu vernachlässigen ist. Sie nimmt jedoch mit fallender Wasserstoffionenkonzentration und steigender Substratkonzentration zu.
Entsprechende Ergebnisse wurden auch bei Verwendung von L-Epicatechin erhalten.
Bei sämtlichen manometrischen Versuchen wurden deshalb stets zwei Gefäße mitlaufen gelassen, die außer der Fer-

mentlösung alle anderen Bestandteile enthielten. Hierdurch konnten gleichzeitig die Autoxydation und andere Druckschwankungen bei der Berechnung des fermentativ verbrauchten Sauerstoffs berücksichtigt werden.

2d. Die Fermentinaktivierung durch Reaktionsprodukte.

Wie aus Abb.1 ersichtlich, findet sowohl bei der Oxydation des D-Catechins als auch bei der des L-Epicatechins mit der Zeit eine Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit statt, wie auch bereits von HATHWAY und SEAKINS beobachtet wurde (20). Ein weiterer Beweis hierfür kann dadurch erbracht werden, daß nach Absinken des Sauerstoffverbrauchs eine erneute Fermentzugabe einen erneuten Sauerstoffverbrauch bewirkt (Abb.5). Dies läßt auf das Vorhandensein von noch nicht oxydiertem Catechin schließen. Ein dieser Beobachtung entsprechendes Ergebnis wurde auch papierchromatographisch erzielt. Untersucht man von dem in Abb.5 angegebenen Reaktionsgemisch vor der erneuten Fermentzugabe 0,01 ml der Reaktionslösung papierchromatographisch, so können noch nicht oxydierte Catechine nachgewiesen werden, die sich mit Vanillin-Salzsäure gelb färben. Als Laufmittel dient Patridge-Gemisch (4:1:5).

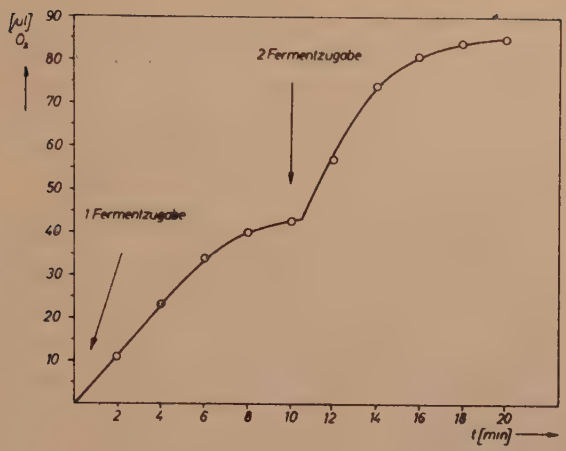


Abb.5: Reaktionsinaktivierung bei der fermentativen Oxydation von D-Catechin.

7,5 mg D-Catechin; 2,0 ml Puffer P_H 6,0; 0,5 ml Ferment (0,30 Cresolase-Einheiten/ml Reaktionslösung). Nach 10 Minuten Zugabe von 0,05 ml Ferment (3,00 Cresolase-Einheiten); 25°.

3. Sekundärreaktionen von fermentativ oxydiertem D-Catechin und L-Epicatechin.

3a. Sekundärreaktionen mit Ascorbinsäure.

METZNER berichtet von mindestens fünf Fermentsystemen, die Ascorbinsäure oxydieren können, von denen jedoch nur die Ascorbinsäureoxydase die Dehydrierung mit Sauerstoff direkt katalysieren kann (21). Die anderen Oxydasen können nur nach vorheriger Oxydation von in der Pflanze vorkommenden Phenolen zu Chinonen die Ascorbinsäure sekundär oxydieren, wobei die Chinone wieder zu den betreffenden Phenolen reduziert werden.

Die Reaktion der Ascorbinsäure mit den Chinonen läuft so schnell und quantitativ ab, daß sie von einzelnen Autoren unter Verwendung von Brenzkatechin als Überträger zur quantitativen Bestimmung der Aktivität der Phenoloxydase verwendet wird (22). Das Auftreten einer chinoiden Färbung der Reaktionslösung deutet auf die vollständige Oxydation der Ascorbinsäure hin.

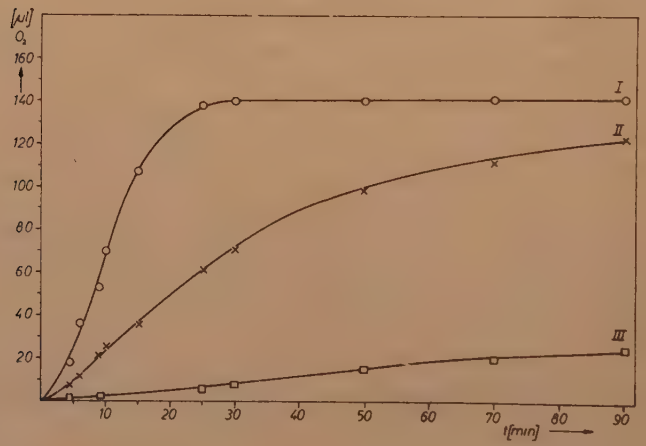


Abb.6: Überträgerwirkung von D-Catechin und L-Epicatechin auf Ascorbinsäure.
I : 50 γ L-Epicatechin + 2,0 mg Ascorbinsäure
II : 50 γ D-Catechin + 2,0 mg Ascorbinsäure
III: 2,0 mg Ascorbinsäure
4,5 ml Puffer P_H 6,2 ; 0,5 ml Ferment (1,35 Cresolase-Einheiten/ml Reaktionsflüssigkeit); 25°.

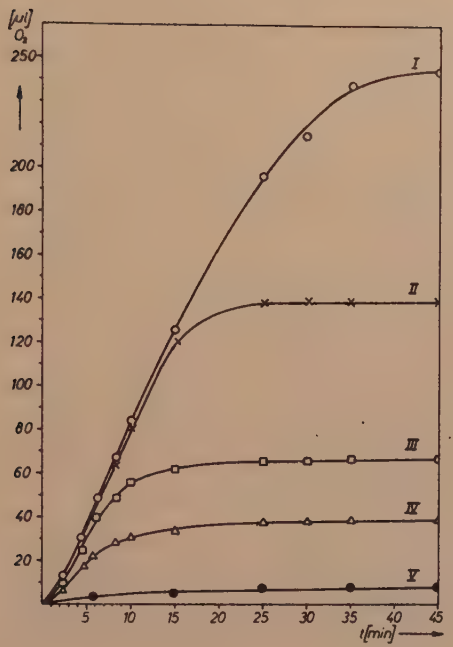


Abb.7: Überträgerwirkung von L-Epicatechin auf wechselnde Mengen Ascorbinsäure.
I : 100 γ L-Epicatechin + 4,0 mg Ascorbinsäure
II : 100 γ L-Epicatechin + 2,0 mg Ascorbinsäure
III: 100 γ L-Epicatechin + 1,0 mg Ascorbinsäure
IV : 100 γ L-Epicatechin + 0,5 mg Ascorbinsäure
V : 4,0 mg Ascorbinsäure
4,5 ml Puffer P_H 6,2; 0,5 ml Ferment (1,35 Cresolase-Einheiten/ml Reaktionsflüssigkeit); 25°.

Vielfach kommen in der Natur Catechine und Ascorbinsäure gemeinsam vor. So berichten GOLJANETZKI und BRJUSCHKOWA, daß in den Teeblättern eine nicht unbedeutende

Menge Ascorbinsäure enthalten ist, die aber bereits in der ersten Stunde der Fermentation vollständig verschwindet, indem sie durch Chinonformen der Catechine oxydiert wird (23). Die in Abb. 6 und 7 dargestellten Versuche zeigen die Überträgerwirkung von D-Catechin und L-Epicatechin auf Ascorbinsäure. Es ist zu erkennen, daß die Überträgerwirkung des L-Epicatechins schneller eintritt und somit die Oxydation gleicher Ascorbinsäuremengen schneller beendet ist als es bei Verwendung des D-Catechins als Überträger der Fall ist (Abb. 6). Dies ist eine Erscheinung, die bei den weiteren Untersuchungen immer wieder zu beobachten ist.

In Abb. 7 ist die Überträgerwirkung gleicher Mengen L-Epicatechin auf unterschiedliche Mengen Ascorbinsäure dargestellt; je größer die Vitaminmenge ist, desto grösser ist der gemessene Sauerstoffverbrauch. Verändert sich die Sauerstoffaufnahme in der Zeiteinheit nicht mehr, so dürfte die Ascorbinsäure vollständig zur Dehydroascorbinsäure oxydiert worden sein.

Die eingesetzten Catechinmengen zeigten unter den verwendeten Reaktionsbedingungen keinen autoxydativen Sauerstoffverbrauch, während die Ascorbinsäure eine geringe Autoxydation ergab.

3b. Sekundärreaktionen mit Rutin.

Das häufig im Pflanzenreich anzutreffende gemeinsame Vorkommen von Catechinen und Rutin macht die Frage interessant, ob und in welchem Maße Catechin nach erfolgter fermentativer Oxydation zum Chinon eine Überträgerwirkung auf Rutin ausübt und so dessen Oxydation fördert. In Untersuchungen über die Oxydation des Rutins durch Phenoloxydase stellte SOMMER (24) etwa zur gleichen Zeit mit anderen Autoren (25,26) fest, daß Rutin in Anwesenheit geringer Mengen Brenzkatechin, Chlorogensäure oder Kaffeesäure sehr leicht oxydierbar ist. Es zeigte sich, daß auch D-Catechin und L-Epicatechin eine derartige Überträgerwirkung ausüben.

Abb.8 macht deutlich, daß die Reaktionsgeschwindigkeit in dem System Ferment/L-Epicatechin/Rutin wieder erheblich größer ist als in dem System Ferment/D-Catechin/Rutin.

Es mag in diesem Zusammenhang darauf hingewiesen sein, daß in neueren Literaturangaben vielfach eine Oxydation des Rutins durch Kartoffel-Oxydase verneint wird. SOMMER konnte jedoch mit der von ihm verwendeten Kartoffel-Präparation einwandfrei eine Oxydation nachweisen (24). Auch meine Versuche zeigten eine - bei den verwendeten Konzentrationen zwar schwache - Wirkung gegenüber dem Rutin, während mit einer aus dem Handel bezogenen Phenoloxydase aus Champignons unter den verwendeten Reaktionsbedingungen keine Oxydation des Rutins festgestellt werden konnte.

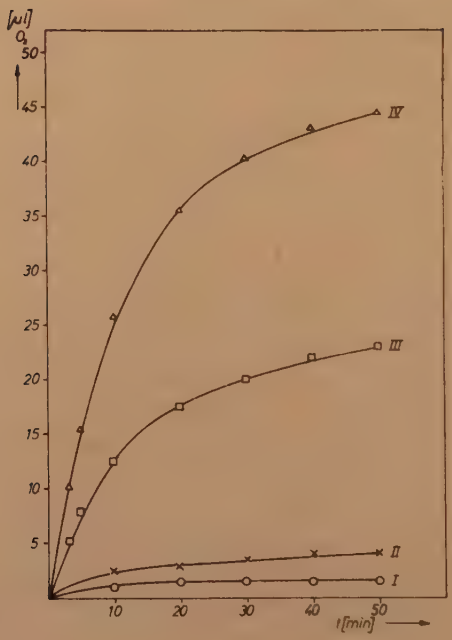


Abb.8: Überträgerwirkung von D-Catechin und L-Epicatechin auf Rutin.
I : 500 γ L-Epicatechin
II : 5,0 mg Rutin
III: 500 γ D-Catechin + 5,0 mg Rutin
IV : 500 γ L-Epicatechin + 5,0 mg Rutin
Das Rutin wurde jeweils in 0,5 ml Methanol gelöst. 3,5 ml Puffer P_H 6,6 ; 0,5 ml Ferment (1,20 Cresolase-Einheiten/ml Reaktionslösung) ; 25°; Ansatz I enthielt zusätzlich 0,5 ml Methanol.

Um mit Sicherheit sagen zu können, daß bei der Einwirkung der Kartoffel-Präparation auf Catechin/Rutin-Gemische eine Überträgerwirkung der Catechin-Chinone auf das Rutin und nicht eine Überträgerwirkung des Rutin-

Chinons auf das Catechin vorliegt, wurde die Präparation aus Champignons in einer Stärke von 0,8 Cresolase-Einheiten/ml Reaktionslösung auf das Gemisch Catechin/Rutin einwirken gelassen. Hierbei ergab sich ein erheblich stärkerer Sauerstoffverbrauch als bei der alleinigen Oxydation des D-Catechins (Abb.9). Somit steht einwandfrei fest, daß durch das Catechin eine Oxydation des Rutins vermittelt wird.

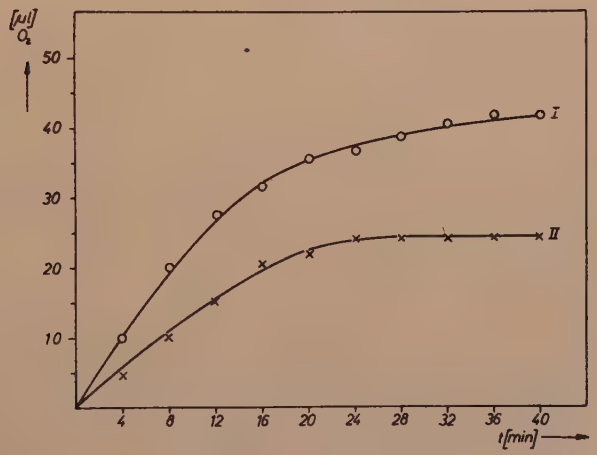


Abb.9: Überträgerwirkung von D-Catechin auf Rutin nach Oxydation des Catechins durch Phenoloxydase aus Champignons.
I : 1000 γ D-Catechin + 3,0 mg Rutin
II: 1000 γ D-Catechin
1,0 ml Methanol; 3,5 ml Puffer P_H 6,6; 0,5 ml Ferment (0,80 Cresolase-Einheiten/ml Reaktionslösung); 25°. Der Ansatz mit Rutin allein zeigte keinen Sauerstoffverbrauch.

3c. Sekundärreaktionen mit Hydrochinon.

Phenoloxydase oxydiert reine Hydrochinonlösungen nicht. In Anwesenheit geringer Mengen Brenzkatechin als Überträger findet eine Oxydation des Hydrochinons statt (27), die in der ersten Reaktionsstufe nach dem folgendem Schema verläuft:

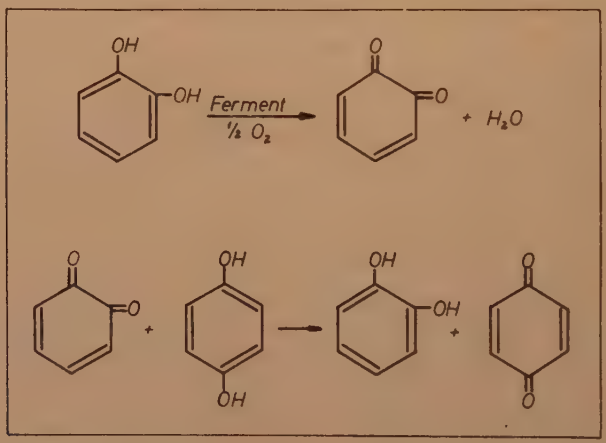


Abb. 10 zeigt, daß das Brenzkatechin auch durch das D-Catechin ersetzt werden kann. Je größer der Überträgerzusatz ist, desto stärker ist die Oxydation des Hydrochinons. Kurve V zeigt den Sauerstoffverbrauch von 1000 γ D-Catechin unter den gleichen Bedingungen, jedoch ohne Gegenwart von Hydrochinon. Die Lösung von 5,0 mg Hydrochinon ohne Zusatz von Catechin zeigte in der Versuchszeit keinen meßbaren Sauerstoffverbrauch. Während sich die Reaktionslösungen der Ansätze I - IV je nach der Catechinkonzentration mehr oder weniger stark rosa färbte, blieb der Vergleichsansatz ohne Überträger farblos.

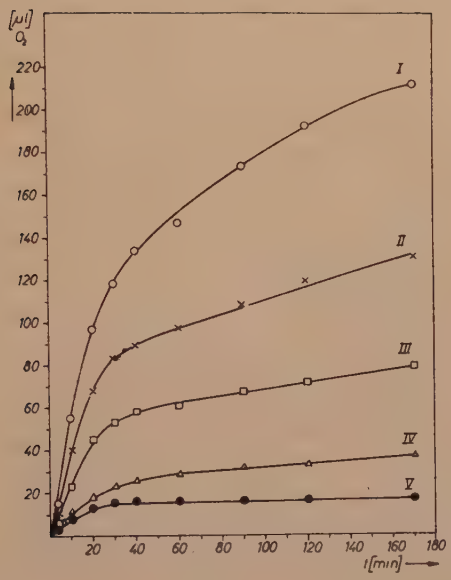


Abb.10: Überträgerwirkung wechselnder Mengen D-Catechin auf Hydrochinon.
I : 1000 γ D-Catechin + 5,0 mg Hydrochinon
II : 500 γ D-Catechin + 5,0 mg Hydrochinon
III: 100 γ D-Catechin + 5,0 mg Hydrochinon
IV : 50 γ D-Catechin + 5,0 mg Hydrochinon
V : 1000 γ D-Catechin.
3,0 ml Puffer P_H 6,8; 0,5 ml Ferment (0,10 Cresolase-Einheiten/ml Reaktionslösung); 25°.

Der aus Abb. 10 zu ersehende Verlauf der Kurven ist insofern überraschend, als zu erwarten wäre, daß bei Einsatz wachsender Mengen Überträgersubstanz bei alleinigem Vorliegen eines Redox-Vorganges die Kurven asymptotisch in einem Bereich auslaufen müßten, dessen untere Begrenzungs-

linie dem Sauerstoffverbrauch von 50 γ D-Catechin + 5,0 mg Hydrochinon und dessen obere Begrenzung dem Sauerstoffverbrauch von 1000 γ D-Catechin + 5,0 mg Hydrochinon entspricht. Diese Erscheinung, deren Ursache noch näher zu untersuchen bleibt, läßt theoretisch mehrere Deutungen zu.

Einmal ist es möglich, daß sich mit der Zeit nicht mehr das gesamte Catechin-Chinon an dem Redoxvorgang beteiligt, sondern daß in einer Nebenreaktion Catechin-Chinon-Einheiten untereinander kondensieren, so daß die Menge des Überträgers laufend abnimmt. Mit dieser Annahme deckt sich die Tatsache, daß bei den Ansätzen mit 50 γ und 100 γ Überträgersubstanz nach erneuter Fermentzugabe nach vier Stunden Reaktionszeit kein vermehrter Sauerstoffverbrauch zu beobachten ist. Zum anderen könnte sich im Verlauf der relativ langen Reaktionszeit ein inaktivierender oder inhibierender Effekt der entstehenden Reaktionsprodukte des Hydrochinons oder des noch nicht oxydierten Hydrochinons bemerkbar machen. Schließlich ist auch eine Kondensation des Catechin-Chinons oder p-Benzochinons mit einem anderen Reaktionspartner nicht auszuschließen.

Abb.11 veranschaulicht die Überträgerwirkung von L-Epicatechin in der gleichen Versuchsanordnung wie in Abb.10.

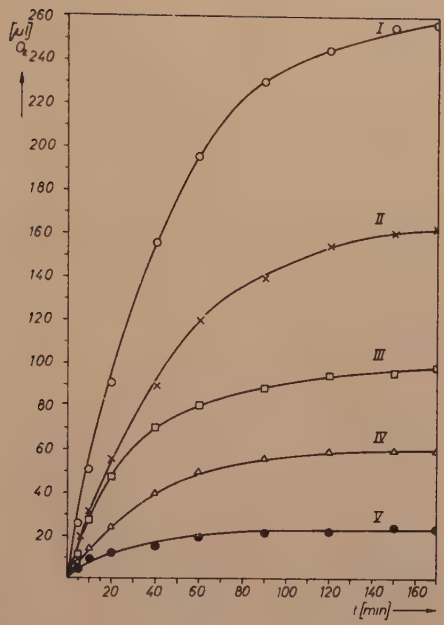


Abb.11: Überträgerwirkung wechselnder Mengen L-Epicatechin auf Hydrochinon.

I : 1000 γ L-Epicatechin + 5,0 mg Hydrochinon
II : 500 γ L-Epicatechin + 5,0 mg Hydrochinon
III: 100 γ L-Epicatechin + 5,0 mg Hydrochinon
IV : 50 γ L-Epicatechin + 5,0 mg Hydrochinon
V : 1000 γ L-Epicatechin.
3,0 ml Puffer P_H 6,8; 0,5 ml Ferment (0,10 Cresolase-Einheiten/ml Reaktionslösung); 25°.

3d. Sekundärreaktionen mit Gallussäure.

Die Gallussäure unterliegt der fermentativen Oxydation durch stärkere Phenoloxydase-Präparationen. Ein Zusatz von Catechin bewirkt einen vermehrten Sauerstoffverbrauch, wie aus Abb.12 ersichtlich ist. Dieser Sauerstoffverbrauch ist größer als die Summe von I und II und deutet auf tiefergehende Sekundärreaktionen.

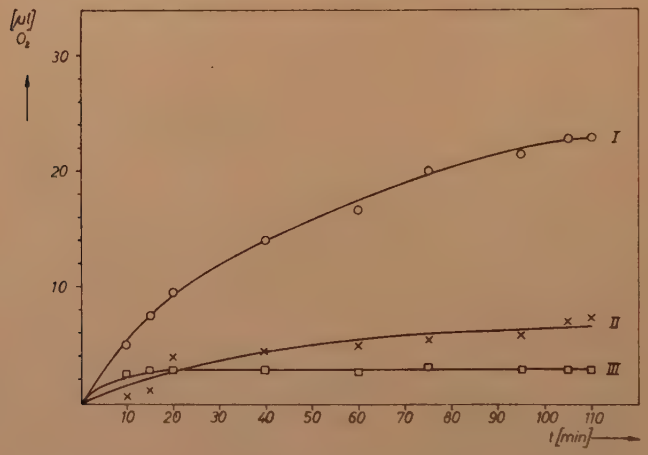


Abb.12: Fermentative Oxydation des Gemisches L-Epicatechin/Gallussäure.
I : 500 γ L-Epicatechin + 5,0 mg Gallussäure
II : 5,0 mg Gallussäure
III: 500 γ L-Epicatechin
3,0 ml Puffer P_H 6,6 ; 0,5 ml Ferment (0,28 Cresolase-Einheiten/ml Reaktionslösung); 25°.

Zur Klärung der Frage, ob das fermentativ gebildete Catechin-Chinon sekundär die Gallussäure oxydiert und um damit eine sekundäre Oxydation des Catechins durch etwa primär gebildetes Gallussäure-Chinon auszuschließen,

wurden in dem in Abb.13 dargestellten Versuch Fermentkonzentrationen verwendet, die die eingesetzten Gallussäurekonzentrationen allein noch nicht oxydierten; es muß also bei der Einwirkung des Fermentes auf dieses Substratgemisch eine primäre Oxydation der Catechine zu den Chinonen eintreten, die dann ihrerseits die Gallussäure oxydieren.

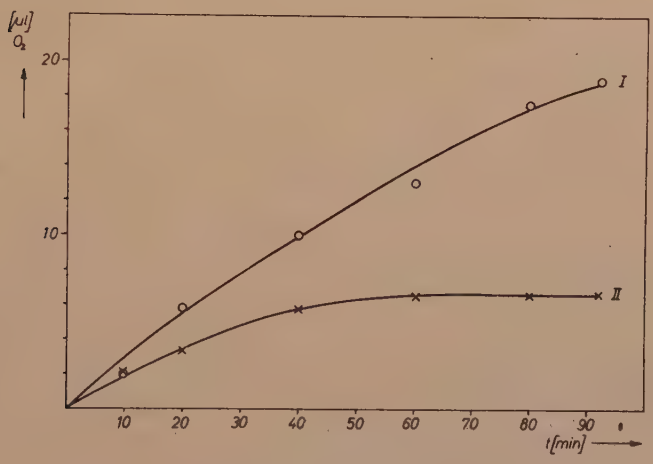


Abb.13: Fermentative Oxydation eines Gemisches L-Epicatechin/Gallussäure.
I : 1000 γ L-Epicatechin + 5,0 mg Gallussäure
II: 1000 γ L-Epicatechin
2,0 ml Puffer P_H 6,8 ; 0,5 ml Ferment(0,19 Cresolase-Einheiten/ml Reaktionslösung); 25°.
5,0 mg Gallussäure zeigten keinen Sauerstoffverbrauch.

3e. Sekundärreaktionen mit α- und ß-Naphthol.

Als weitere Substrate zog ich zu meinen Untersuchungen α- und ß-Naphthol heran. Beide Verbindungen sind bisher noch nicht auf ihre Oxydierbarkeit durch Phenoloxydase untersucht worden. Theoretisch war eine Oxydation des α-Naphthols nicht zu erwarten. Monophenolische Stoffe, die in der einen o-Stellung zur Hydroxylgruppe substituiert sind, werden auf Grund unserer bisherigen Kenntnisse nicht oxydiert (28). Beim ß-Naphthol konnte jedoch auf Grund der Stellung der OH-Gruppe eine Oxydation möglich sein, wobei allerdings zu brücksichtigen ist, daß der Einfluß des zweiten aromatischen Ringes noch nicht vorauszusehen war.

Die theoretische Möglichkeit einer Oxydation des ß-Naphthols durch Phenoloxydase konnte praktisch nicht bestätigt werden. Es war keine Oxydation zu erkennen. Die Reaktionsansätze für diese Versuche hatten folgende Zusammensetzung:

5,0 mg α-Naphthol bzw. 5,0 mg ß-Naphthol, gelöst in
0,5 ml Methanol
1,5 ml Puffer P_H 7,0
0,5 ml Fermentlösung (16,00 Cresolase-Einheiten/ml Reaktionslösung).

Untersuchungen über eine Überträgerwirkung der Catechine auf die beiden Naphthole ergaben, daß in dem System Ferment/D-Catechin/α-Naphthol innerhalb von drei Stunden kein vermehrter Sauerstoffverbrauch eintrat. Dagegen konnte in dem System Ferment/D-Catechin/ß-Naphthol eine Ver-

stärkung der Reaktionsgeschwindigkeit beobachtet werden (Abb.14).

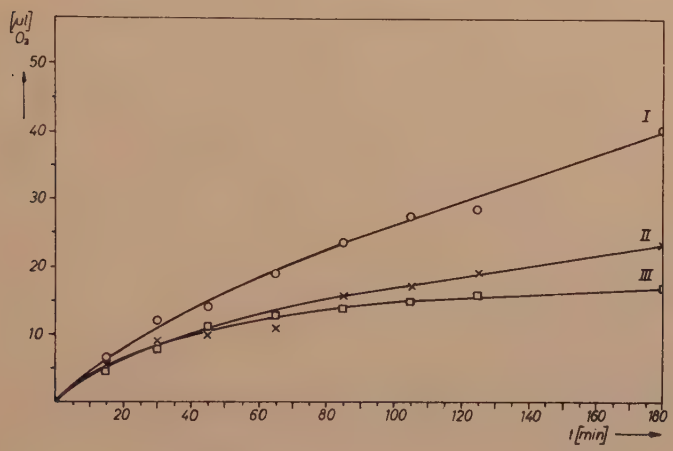


Abb.14: Oxydationsverlauf des Systems Phenoloxydase/D-Catechin/ß-Naphthol.
I : 1000 γ D-Catechin + 5,0 mg ß-Naphthol
II : 500 γ D-Catechin + 5,0 mg ß-Naphthol
III: 1000 γ D-Catechin
0,5 ml Methanol ; 2,5 ml Puffer P_H 7,6; 0,5 ml Ferment (0,45 Cresolase-Einheiten/ml Reaktionslösung); 25°.

Abb. 15 stellt graphisch den Sauerstoffverbrauch des obigen Ansatzes nach einer Reaktionszeit von 19 Stunden dar.

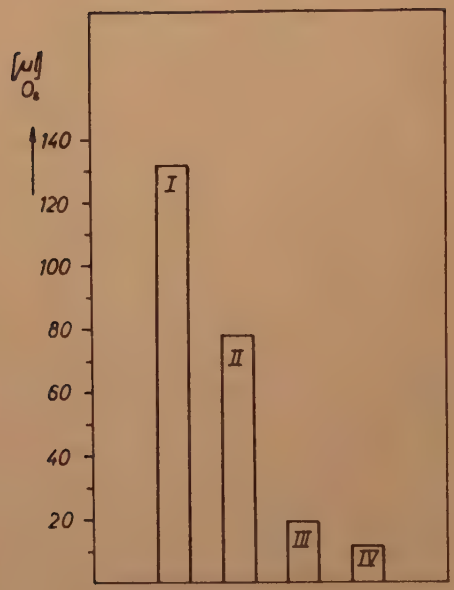


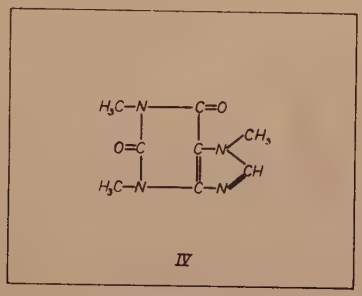
Abb.15: Gesamtsauerstoffverbrauch des Systems Phenoloxydase/D-Catechin/ß-Naphthol nach 19 Stunden Reaktionszeit.

I : 1000 γ D-Catechin + 5,0 mg ß-Naphthol
II : 500 γ D-Catechin + 5,0 mg ß-Naphthol
III: 1000 γ D-Catechin
IV : 500 γ D-Catechin

0,5 ml Methanol ; 2,5 ml Puffer P_H 7,6; 0,5 ml Ferment (0,45 Cresolase-Einheiten/ml Reaktionslösung); 25°.

4. Die fermentative Oxydation von Catechin/Coffein-Gemischen.

Eine Oxydation des Coffeins durch die Phenoloxydase allein konnte nicht festgestellt werden. Sie war auch auf Grund der Struktur (IV) nicht zu erwarten.



IV

Da jedoch das Coffein zusammen mit Catechinen in der Natur vorkommt (29), lag es nahe zu untersuchen, ob das Coffein die Oxydation des Systems Phenoloxydase/Catechin beeinflußt und ob durch Vermittlung des Catechins durch die Phenoloxydase ein sekundärer Angriff des Coffeins eintritt. Hierzu wurde zunächst die Oxydation von Catechinlösungen ohne und mit Zusatz von Coffein manometrisch untersucht. Der P_H-Wert der Reaktionslösungen wurde durch den Coffeinzusatz nicht verändert (gemessen mit dem P_H-Meßgerät nach KNICK), so daß eine Beeinflussung der Catechinoxydation lediglich durch eine P_H-Verschiebung ausgeschlossen ist. Abb.16 zeigt einen deutlichen Mehrverbrauch von Sauerstoff bei der fermentativen Oxydation von D-Catechin/Coffein-Asätzen gegenüber der fermentativen Oxydation von D-Catechin allein.

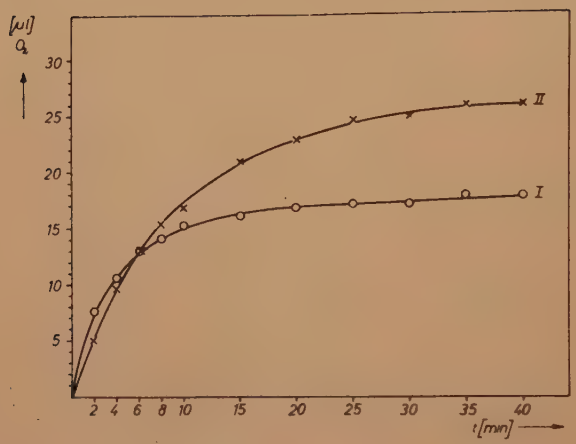


Abb.16: Fermentative Oxydation von D-Catechin und D-Catechin/Coffein-Gemisch.
I : 3,5 mg D-Catechin
II: 3,5 mg D-Catechin + 15,0 mg Coffein
2,0 ml Puffer P_H 6,0 ; 0,5 ml Ferment (1,20 Cresolase-Einheiten/ml Reaktionslösung); 25°.

Analog liegen die Verhältnisse bei der fermentativen Oxydation von L-Epicatechin in Gegenwart von Coffein (Abb.17).

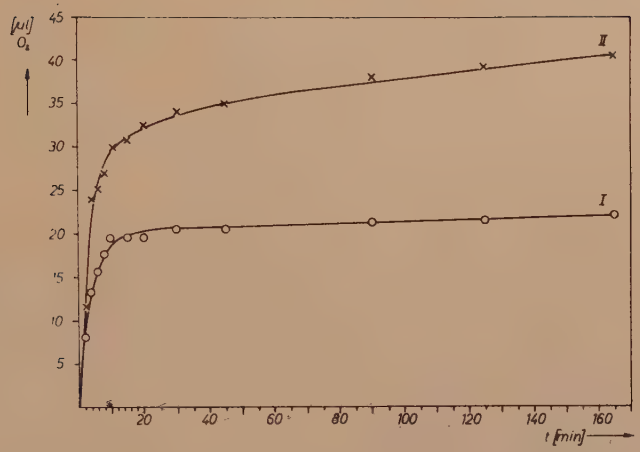


Abb.17: Fermentative Oxydation von L-Epicatechin und L-Epicatechin/Coffein-Gemisch.
I : 3,5 mg L-Epicatechin
II: 3,5 mg L-Epicatechin + 4 mg Coffein.
2,0 ml Puffer P_H 6,6 ; 0,5 ml Ferment (1,20 Cresolase-Einheiten/ml Reaktionslösung); 25°.

Hiermit konnten die Ergebnisse von ZLATAROFF und POPPOFF (11) bestätigt werden.

Auch auf spektralphotometrischem Wege konnte eine Beschleunigung der Catechin-Oxydation durch Coffein festgestellt werden.

Hierzu wurden in einen 30 ml-Standzylinder, der mit einer Schliffhülse verschlossen ist, die Reaktionslösungen gegeben. Bis zum Boden des Gefäßes ragte ein Glasrohr, welches an eine Luftpumpe angeschlossen ist und eine Begasung der Reaktionslösung gestattet. Der Standzylinder wird in einem Thermostaten befestigt. Während der Reaktion, die bei 25° abläuft, perlt ein konstanter Luftstrom durch das

Gefäß. Die Reaktion wird durch Zugabe des Fermentes aus einer Pipette gestartet. Nach 5 bzw. 45 Minuten werden 2 ml der Reaktionsflüssigkeit entnommen und in einen Meßkolben, in dem sich 5 ml Methanol befinden, überführt. Nach Temperaturausgleich wird der Meßkolben bis zur 10 ml-Marke aufgefüllt. Die so vorbereitete klare Lösung wird dann in 1 cm-Küvetten ein einem Spektrophotometer Zeiss Opton M 4 Q im Bereich von 520 mμ bis 340 mμ gemessen. Bei der zweiten Entnahme nach 45 Minuten sind schon Reaktionsprodukte ausgefallen, die in Methanol in Lösung gehen, so daß sich eine Filtration erübrigt. Als Vergleichslösung wurde eine Lösung verwendet, die alle Bestandteile außer dem Catechin enthielt. Übereinstimmend mit den in der WARBURG-Apparatur erzielten Ergebnissen wurde auch hierbei in der Zeiteinheit eine Zunahme der Farbintensität der Lösung mit steigender Coffeinmenge beobachtet.

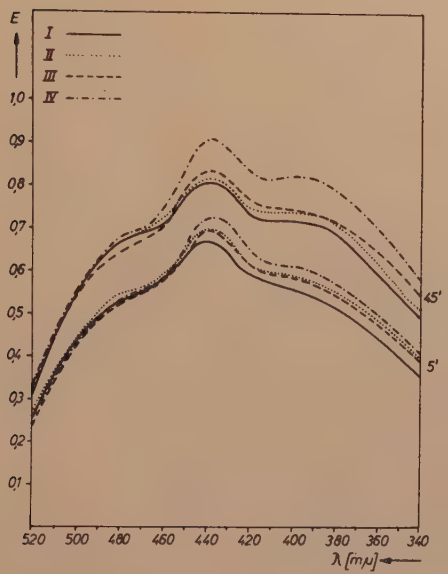


Abb.18: Spektralphotometrische Verfolgung der fermentativen Oxydation von D-Catechin/Coffein-Gemischen (nach 5 und 45 Minuten Reaktionszeit).
I : 7,25 mg D-Catechin
II : 7,25 mg D-Catechin + 21 mg Coffein
III: 7,25 mg D-Catechin + 50 mg Coffein
IV : 7,25 mg D-Catechin + 150 mg Coffein
20,0 ml Puffer P_H 6,0; 5,0 ml Ferment (0,60 Cresolase-Einheiten/ml Reaktionslösung); 25°, nach 5 und 45 Minuten wurden 2,0 ml entnommen und mit Methanol auf 10,0 ml aufgefüllt.

Es tauchte die Frage auf, ob der vermehrte Sauerstoffverbrauch auf eine sekundäre Oxydation des Coffeins oder auf eine andere Reaktion zurückzuführen ist. Um hierüber eine nähere Aussage machen zu können, mußte festgestellt

werden, ob im Verlauf der Reaktion eine Abnahme des Coffeingehaltes eintritt. Hierzu wurde eine papierchromatographische Bestimmungsmethode entwickelt, die es gestattet, das Coffein in dem Reaktionsgemisch quantitativ zu bestimmen.

Die das Coffein, D-Catechin, den Puffer und das Ferment enthaltenden Reaktionsansätze wurden in WARBURG-Gefäßen angesetzt und bei 25° bzw. bei 37° bei einer Frequenz von 120 U/min. geschüttelt. Nach verschiedenen Zeiten wurden 1 ml-Proben entnommen; diese wurden mit der gleichen Menge Methanol versetzt und davon 0,01 bzw. 0,02 ml auf Whatman-Papier Nr. 1 aufgetragen. Nach dem Entwickeln des Chromatogramms wurde das Coffein im UV-Licht sichtbar gemacht, ein immer gleich großes Stück Papier mit dem Coffein-Fleck ausgeschnitten und das Alkaloid mit 10,0 ml Wasser in einem 20 ml-Standzylinder durch häufiges Umschütteln des Gefäßes eluiert. Nach einer Stunde wurde das Eluat filtriert und in 1cm-Quarzküvetten die Durchlässigkeit der Lösung bei 273 m µ gemessen. Zur Gewinnung der Vergleichslösung wurde ein gleich großes, ebenso behandeltes Stück Papier, aus einem dem Coffein entsprechenden R_f-Bereich wie oben eluiert.

In einem Vorversuch wurde ermittelt, ob der P_H-Wert einen Einfluß auf die Menge des gefundenen Coffeins hat. Es zeigte sich nämlich, daß zur Abtrennung des Coffeins von den Polyphenolen und deren Oxydationsprodukten ein alkalisches Laufmittel am besten geeignet war.

Der Vergleich wurde mit Laufmitteln folgender Zusammensetzung ausgeführt:

Sauer: Butanol - Eisessig - Wasser (4:1:5)
Alkalisch: Butanol, gesättigt mit 0,1%iger Ammoniaklösung.

Hierzu wurden jeweils 10,0 mg Coffein in 5,0 ml Wasser gelöst; davon wurde 1,0 ml entnommen, mit 1,0 ml Methanol versetzt und davon 0,02 ml aufgetragen; nach etwa achtstündigem Laufen wurde nach oben beschriebener Art eluiert und die Durchlässigkeit spektrophotometrisch bestimmt.
Je vier verschiedene Ansätze zeigten folgendes Ergebnis:

1. Alkalisch	2. Sauer
a.) 33,5% Durchlässigkeit	33,5% Durchlässigkeit
b.) 34,1% "	34,3% "
c.) 33,2% "	33,9% "
d.) 35,0% "	34,8% "

Der P_H-Wert des Laufmittels hat also auf das Ergebnis der Methode zur Bestimmung des Coffeingehaltes keinen Einfluß, so daß die Untersuchungen unter Verwendung des alkalischen Laufmittels durchgeführt werden konnten.
Es zeigte sich, daß bei der fermentativen Oxydation von Catechin/Coffein-Gemischen keine Abnahme des Coffein-Gehaltes eintritt. Die Versuche wurden bis zu einer Dauer von acht Stunden durchgeführt.

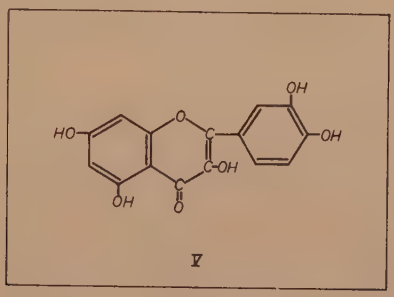
Tabelle 1: Quantitative Coffein-Bestimmung in dem System Ferment/D-Catechin/Coffein.
Reaktionsansätze:
a.) 5,0 mg Coffein + 6,0 mg D-Catechin
b.) 5,0 mg Coffein
3,0 ml Puffer P_H 6,6; 1,0 ml Ferment (15,00 Cresolase-Einheiten/ml Reaktionslösung); 25°;
0,02 ml auf Chromatogramm aufgetragen.
Die Werte stellen die Mittelwerte von drei Messungen dar.

Meßzeit (h)	Durchlässigkeit (%)	
	a	b
1	56,8	56,1
4	55,5	55,9
8	56,0	56,3

Tabelle 2: Quantitative Coffein-Bestimmung in dem System Ferment/D-Catechin/Coffein.
a.) 8,0 mg Coffein + 6,0 mg D-Catechin
b.) 8,0 mg Coffein
3,0 ml Puffer P_H 6,6; 1 ml Ferment (15,00 Cresolase-Einheiten/ml Reaktionslösung); 37°;
0,01 ml auf Chromatogramm aufgetragen.
Die Werte stellen die Mittelwerte von drei Messungen dar.

Meßzeit (h)	Durchlässigkeit (%)	
	a	b
1	89,0	90,1
4	90,2	90,0
8	89,5	89,9

Es trat nun die Frage auf, ob das Coffein auch noch gegenüber anderen Substraten der Phenoloxydase oxydationsfördernde Eigenschaften zeigt. Hierzu wurde zunächst das dem Catechin sehr ähnlich gebaute Quercetin herangezogen (V).



V

Es konnte ebenfalls in Anwesenheit von Coffein eine Beschleunigung der Oxydation festgestellt werden, wie aus den in Abb. 19 dargestellten Versuchen ersichtlich wird. Die Schwerlöslichkeit von Quercetin bedingte die Verwendung von Methanol und den Einsatz verhältnismäßig geringer Substratmengen. Zu bemerken ist, daß bei der Fermentzugabe zu den Reaktionsansätzen mit Quercetin eine vorübergehende Blaufärbung zu beobachten ist, die bei den Ansätzen mit Coffein intensiver auftritt. Diese Farbänderung wurde jedoch nicht näher untersucht.

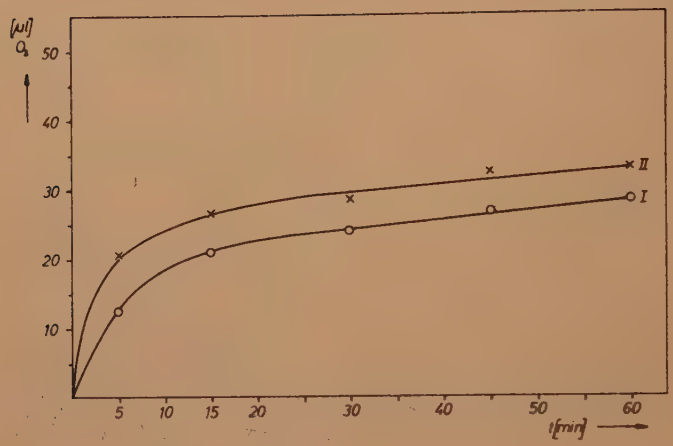
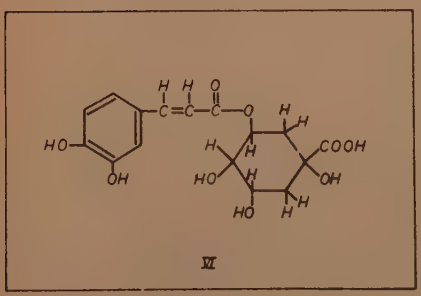
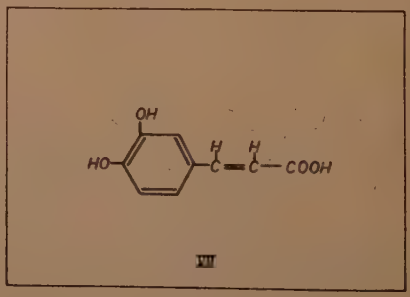


Abb.19: Fermentative Oxydation von Quercetin und Quercetin/Coffein-Gemisch.
I : 500 γ Quercetin
II: 500 γ Quercetin + 4,0 mg Coffein
0,5 ml Methanol; 1,5 ml Puffer P_H 6,8; 0,5 ml Ferment (24,00 Cresolase-Einheiten/ml Reaktionslösung); 25°.

Des weiteren wurden die in der Natur sehr häufig vorkommenden Zimtsäurederivate Chlorogensäure (VI) und Kaffeesäure (VII)



VI



VII

darauf untersucht, ob auch bei diesen Substraten Coffeinzusatz eine Beschleunigung der fermentativen Oxydation bewirkt. Es sollte hiermit festgestellt werden, ob Coffein eine entsprechende Wirkung auch auf die Oxydation anders gebauter Verbindungen ausübt. Manometrische Versuche zeigten jedoch keine Beschleunigung der Oxydation der Chlorogensäure in Gegenwart des Coffeins (Abb.20). Ähnliche Ergebnisse wurden auch bei Verwendung von Kaffeesäure als Substrat erhalten.

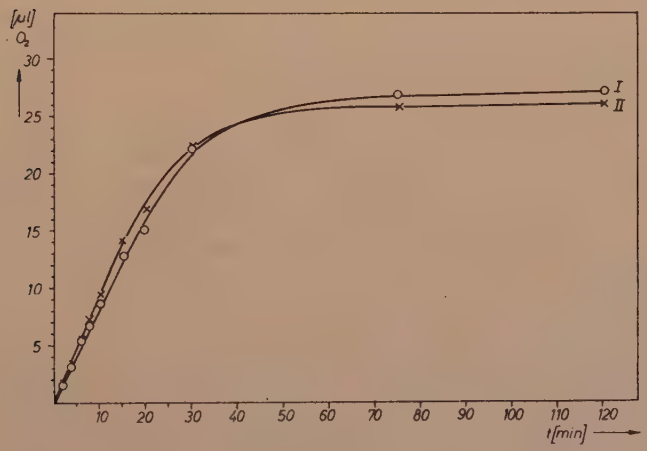


Abb.20: Fermentative Oxydation von Chlorogensäure und Chlorogensäure/Coffein-Gemisch.
I : 8,0 mg Chlorogensäure
II: 8,0 mg Chlorogensäure + 4,0 mg Coffein
2,0 ml Puffer P_H 6,8; 0,5 ml Ferment (0,90 Cresolase-Einheiten/ml Reaktionslösung); 25°.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen, daß die Phenoloxydase allein und in Gegenwart von Catechin keine Abnahmen des Coffeingehaltes bewirken kann. Trotzdem wird bei der Oxydation des Catechins in Gegenwart von Coffein eine Beschleunigung der Reaktionsgeschwindigkeit festgestellt. Anders gebaute phenolische Stoffe, wie Chlorogensäure oder Kaffeesäure, zeigen bei der fermentativen Oxydation in Gegenwart von Coffein diese Beschleunigung nicht. Eine abschließende Klärung dieser Erscheinung gelang bisher nicht. Die Tatsache, daß die fermentative Oxydation bestimmter Stoffe durch Coffein nicht beschleunigt wird, schließt eine direkte Fermentaktivierung durch das Alkaloid aus.

Eine Deutung kann jedoch unter Berücksichtigung der durch Gerbstoffe erfolgenden Fermentinhibition bzw. -inaktivierung möglicherweise erfolgen.

FRIEDRICH berichtet über Untersuchungen, die die fermenthemmende Wirkung von Gerbstoffen auf ß-Glukosidase zum Gegenstand haben; durch Bindung des Gerbstoffs an Hautpulver konnte die Aktivität des Fermentes völlig regeneriert werden (30). THUNBERG stellte eine stark hemmende Wirkung von Tanningerbstoff auf Dehydrasen fest (31). DAWSON und NELSON weisen auf die Schädigung der Phenoloxydase bei der Oxydation ihrer Substrate durch die entstehenden Oxydationsprodukte hin (32). HERRMANN gebraucht den Ausdruck "Chinongerbung", da es sicherlich das gebildete Chinon ist,

welches sich mit Eiweiß verbindet (33).
Coffein kann nun mit Catechingerbstoffen in der Kälte schwer lösliche Additionsverbindungen bilden (34,35,36). Es wäre denkbar, daß eine derartige lockere Bindung des Coffeins an eines der Reaktionsprodukte, das für die Inaktivierung des Fermentes mitverantwortlich ist, den inaktivierenden Einfluß auf das Ferment aufhebt oder schwächt. Mit den Oxydationsprodukten der Chlorogensäure und der Kaffeesäure, die strukturell andersartig aufgebaut sind als die der Catechine, könnte nach dieser Theorie das Coffein dann derartige Bindungen nicht eingehen.

5. Die Einwirkung von Catechinen auf die fermentative Oxydation von Cresolen.

In der Fermentchemie dient p-Cresol bekanntlich als Substrat für die Bestimmung der Phenoloxydase-Aktivität. Bevor eine maximale, lineare Sauerstoffaufnahme vorliegt, haben Monophenole bei der Oxydation eine Induktionszeit, deren Länge von der Art und Konzentration des Substrates, des P_H-Wertes, der Temperatur, von der Fermentkonzentration usw. abhängt (37,38). Im Zusammenhang mit der Thematik dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob ein Zusatz von Catechinen einen Einfluß auf die Oxydation von p-Cresol und m-Cresol hat. Abb.21 gibt den Oxydationsverlauf in p-Cresol-Ansätzen mit und ohne Catechinzusatz wieder.

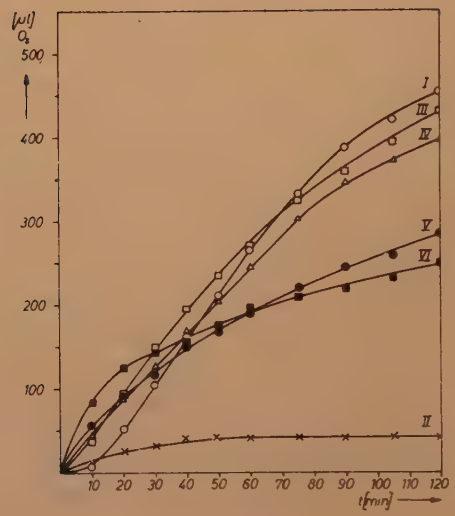


Abb.21: Fermentative Oxydation von Catechin/p-Cresol-Gemischen.

I : 5,0 mg p-Cresol
II : 1000 γ D-Catechin
III: 50 γ D-Catechin + 5,0 mg p-Cresol
IV : 100 γ D-Catechin + 5,0 mg p-Cresol
V : 500 γ D-Catechin + 5,0 mg p-Cresol
VI : 1000 γ D-Catechin + 5,0 mg p-Cresol
3,0 ml Puffer P_H 6,8; 0,5 ml Ferment (0,39 Cresolase-Einheiten/ml Reaktionslösung); 25°.

Der Zusatz von Catechin bewirkt eine Verkürzung der Induktionszeit, was auf eine Überträgerwirkung zurückzuführen ist. Das diphenolische Catechin wird von dem Ferment zum entsprechenden Chinon oxydiert, das dann seinerseits das p-Cresol angreift. Die hier beobachtete Überträgerwirkung macht sich jedoch nur in einem vorzei-

tigen Einsetzen und einer Beschleunigung der Anfangs-Reaktionsgeschwindigkeit bemerkbar. Der weitere Reaktionsverlauf zeigt eine Inhibition durch das Catechin bzw. dessen Reaktionsprodukte. Nach 50 bis 60 Minuten wurde die Reaktionsgeschwindigkeit im Catechin/p-Cresol-Gemisch kleiner als bei der Oxydation des p-Cresols allein. Das Diagramm in Abb.22 zeigt den Einfluß variierender Catechin-Mengen auf die p-Cresol-Oxydation nach 24 Stunden.

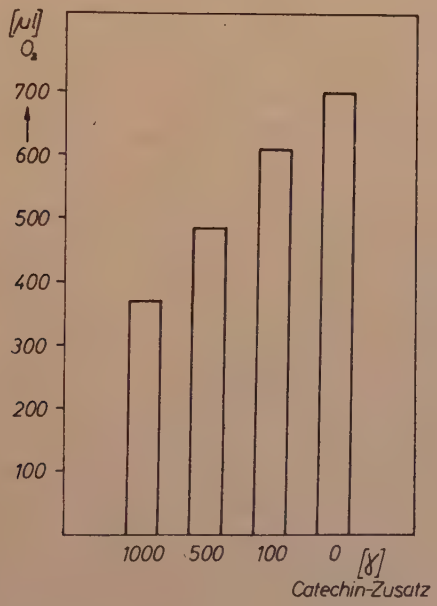


Abb.22: Sauerstoffverbrauch bei der fermentativen Oxydation von Catechin/p-Cresol-Gemischen nach einer Reaktionszeit von 24 Stunden.
5,0 mg p-Cresol; 3,0 ml Puffer P_H 6,8; 0,5 ml Ferment (0,39 Cresolase-Einheiten/ml Reaktionslösung); 25°; variierende Mengen D-Catechin.

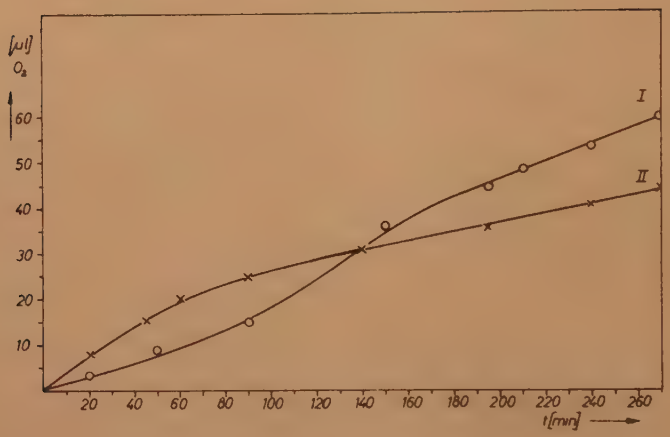


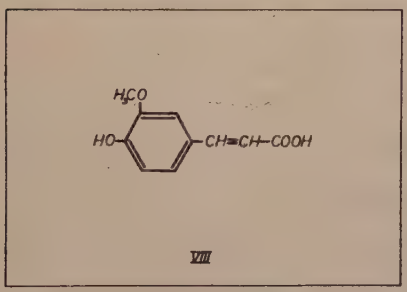
Abb.23: Fermentative Oxydation von Catechin/m-Cresol-Gemischen.
I : 5,0 mg m-Cresol
II: 100 γ D-Catechin + 5,0 mg m-Cresol
3,0 ml Puffer P_H 6,8; 0,5 ml Ferment (1,93 Cresolase-Einheiten/ml Reaktionslösung); 25°.

Auch in dem System Ferment/Catechin/m-Cresol konnte eine Verkürzung der Induktionszeit festgestellt werden. Die in dem System Ferment/Catechin/p-Cresol beobachteten Hemmeffekte zeigten sich hierbei ebenfalls (Abb.23). Die fermentative Oxydierbarkeit von m-Cresol ist bisher noch nicht untersucht worden. Es konnte eine Oxydation durch die Phenoloxydase festgestellt werden, die allerdings erheblich geringer als beim p-Cresol ist.

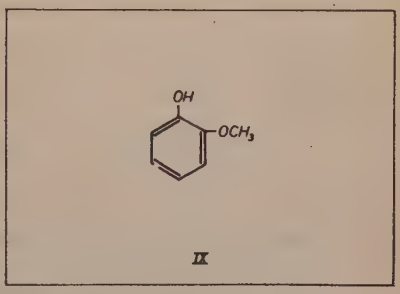
Bei Ansätzen mit einem fünffach stärkeren Ferment ist der Sauerstoffverbrauch, der bei der Oxydation von m-Cresol erfolgt, nur etwa 1/10 des bei der Oxydation von p-Cresol gemessenen Verbrauchs.

Eine Oxydation von o-Cresol wurde, wie bereits von FRÖMMING (28) berichtet, trotz einer Einwirkungsdauer von drei Tagen nicht beobachtet. Auch bei Zusatz von D-Catechin als Überträger wurde kein Hinweis auf eine Oxydation erhalten.

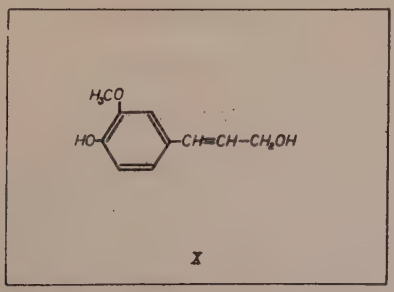
Vergleichsversuche zeigten, daß auch bei anderen o-substituierten monophenolischen Körpern, die von dem Ferment allein nicht oxydiert werden, bei Zusatz von D-Catechin als Überträger ebenfalls keine Oxydation feststellbar war. Zu diesen Untersuchungen wurden Ferulasäure (VIII), Guajakol (IX) und Coniferylalkohol (X) herangezogen.



VIII



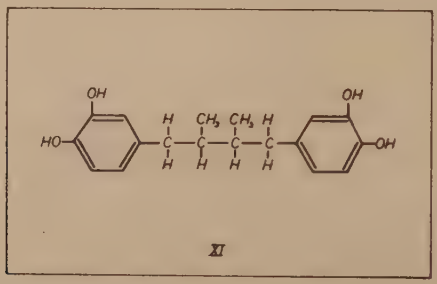
IX



X

6. Die Einwirkung von Catechin auf die fermentative Oxydation von Nordihydroguajaretsäure.

Die Nordihydroguajaretsäure (NDGA, XI) wurde von mehreren Autoren (39-41) in den Blättern verschiedener Larrea-Arten bis zu einem Gehalt von 12% nachgewiesen.



XI

Ihre Oxydierbarkeit durch das Ferment Phenoloxydase ist bisher noch nicht untersucht worden. Die Benutzung als Antioxydans in der Lebensmittelindustrie macht die Frage interessant, ob bei Zusatz geringer Catechinmengen eine Beeinflussung der Oxydation der Nordihydroguajaretsäure erfolgt. Bei den Versuchen bereitete die Schwerlöslichkeit der Substanz in Wasser Schwierigkeiten; deshalb mußte in einer 20%igen Methanollösung gearbeitet werden, was zur Folge hatte, daß die Oxydation mit einer verhältnismäßig großen Fermentmenge durchgeführt werden mußte, da die Aktivität durch den Alkoholzusatz vermindert wurde. Sie sinkt bei dieser Alkoholkonzentration etwa um die Hälfte (24).

Abb.24 und 25 zeigen die Verhältnisse bei der Oxydation von NDGA/Catechin-Gemischen. Beide Abbildungen

verdeutlichen, daß bei Anwesenheit von Catechin unter den verwendeten Versuchsbedingungen der Sauerstoffverbrauch geringer ist als bei der Oxydation der Nordihydroguajaretsäure allein.

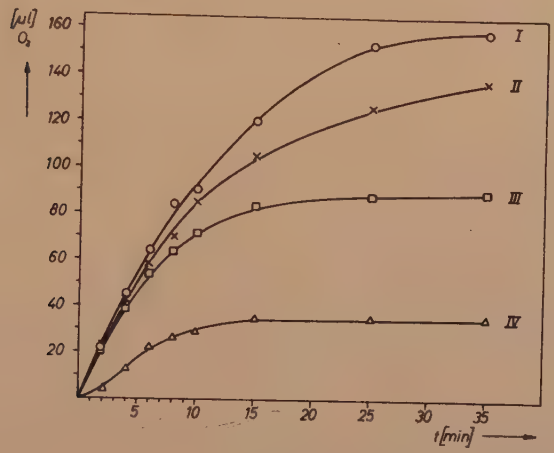


Abb.24: Fermentative Oxydation von L-Epicatechin/NDGA-Gemisch.
I : 5,0 mg NDGA
II : 300 γ L-Epicatechin + 5,0 mg NDGA
III: 600 γ L-Epicatechin + 5,0 mg NDGA
IV : 600 γ L-Epicatechin
1,0 ml Methanol; 3,5 ml Puffer P_H 6,2; 0,5 ml Ferment (4,50 Cresolase-Einheiten/ml Reaktionslösung); 25°.

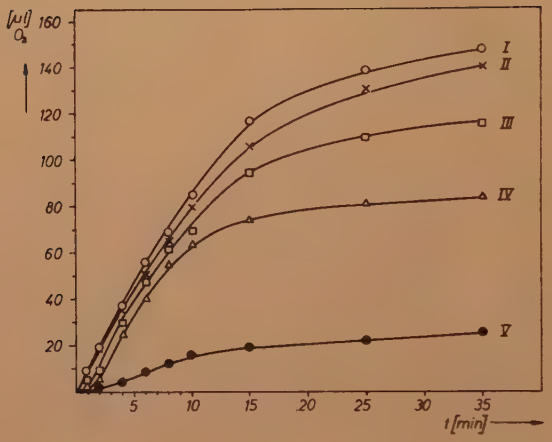


Abb.25: Fermentative Oxydation von D-Catechin/NDGA-Gemisch.

I : 5,0 mg NDGA

II : 100 γ D-Catechin + 5,0 mg NDGA

III: 250 γ D-Catechin + 5,0 mg NDGA

IV : 500 γ D-Catechin + 5,0 mg NDGA

V : 500 γ D-Catechin

1,0 ml Methanol; 3,5 ml Puffer P_H 6,2; 0,5 ml Ferment (4,50 Cresolase-Einheiten/ml Reaktionslösung); 25°.

D. Zusammenfassung

Das weit verbreitete Vorkommen von Catechinen in der Natur, die Fähigkeit der Phenoloxydase, D-Catechin und L-Epicatechin über das Chinon zu Catechingerbstoffen zu oxydieren und die Reaktionsfreudigkeit der Chinone machten eine Reihe von Untersuchungen interessant, die in Anlehnung an die Verhältnisse im Pflanzenreich im Modellversuch Aufschluß über Sekundärreaktionen bei der fermentativen Oxydation von Catechinen geben sollten.

Manometrische und papierchromatographische Untersuchungen zeigten, daß L-Epicatechin mit einer größeren Reaktionsgeschwindigkeit oxydiert wird als D-Catechin. Dies hatte auch im allgemeinen einen stärkeren Überträgereffekt des L-Epicatechins zur Folge.

Ascorbinsäure und Hydrochinon, die von der Phenoloxydase allein nicht angegriffen werden, wurden in Gegenwart kleiner Catechinmengen als Überträger oxydiert. Auch in dem System Ferment/Catechin/ß-Naphthol konnte eine Verstärkung der Reaktionsgeschwindigkeit festgestellt werden, die u.U. auf eine Oxydation des ß-Naphthols zurückgeführt werden kann. Andere Substrate, die erst von stärkeren Fermentkonzentrationen oxydiert werden, wie Rutin oder Gallussäure, erfuhren eine schnellere Oxydation, wenn kleinere Catechin-Konzentrationen zugegen waren, auch wenn die Fermentkonzentration so gering war, daß Rutin oder

Gallussäure allein nicht angegriffen wurden.
Zusatz geringer Catechin-Mengen zu p-, m- und o-Cresol ergab gegenüber der fermentativen Oxydation von p- und m-Cresol allein eine Verkürzung der Reaktionszeit. Der absolute Sauerstoffverbrauch wurde jedoch über eine längere Reaktionszeit vermindert, was im weiteren Verlauf auf eine Inhibition schließen läßt. o-Cresol, das von der Phenoloxydase allein nicht oxydiert wird, ist auch bei Zusatz von Catechinen nicht oxydierbar. Das gleiche Ergebnis wurde bei Verwendung der ebenfalls in o-Stellung zur OH-Gruppe substituierten phenolischen Stoffe Ferulasäure, Guajakol, Coniferylalkohol und α-Naphthol erhalten.
Die Untersuchungen einer Einwirkung der Phenoloxydase auf Coffein ergaben folgende Ergebnisse:
Coffein wird von der Phenoloxydase allein nicht oxydiert. Die Gegenwart von Coffein bewirkt bei der fermentativen Oxydation von D-Catechin und L-Epicatechin einen vermehrten Sauerstoff-Verbrauch. Dieser rührt jedoch nicht von einer sekundären Oxydation des Alkaloids her, wie mit Hilfe quantitativer Bestimmungen ermittelt wurde. Es kann daher angenommen werden, daß Coffein-Verluste bei der Fermentation von Tee oder Kakao nicht auf diesem Wege zustandekommen. Eine Erklärung für diese Beobachtungen wäre darin zu sehen, daß bei der fermentativen Oxydation von Catechin das Coffein die Rolle eines Protektors spielt, indem es durch Bindung des fermentativ entstandenen Gerbstoffs

dessen destruktive Wirkung auf den Protein-Anteil des Fermentes abschwächt und das Ferment somit eine stärkere Aktivität behalten kann. Die gleiche Beobachtung konnte in dem System Ferment/Quercetin/Coffein gemacht werden, während bei der Oxydation von Chlorogensäure und Kaffeesäure in Gegenwart von Coffein diese Wirkung nicht auftrat.

Die vorliegende Arbeit, die sich an eine Reihe von Untersuchungen in unserem Institut über die Überträgerwirkungen von Stoffen, die von der Phenoloxydase angegriffen werden, auf solche, die nicht oder nur schwer von dem Enzym oxydierbar sind, anschloß, hatte das D-Catechin und das L-Epicatechin als Substrate zum Untersuchungsobjekt. Aus der Vielzahl der phenolischen Stoffe in der Natur und der sie begleitenden nicht phenolischen Stoffe läßt sich noch manches Modell konstruieren, dessen Verhalten gegenüber Phenoloxydase in vitro uns interessanten Erkenntnissen über die Verhältnisse in vivo näher bringt.

E. Literaturverzeichnis

1 HERRMANN,K. Z. Lebensmittelunters. u. -Forsch. 109,487 (1959)

2 FREUDENBERG,K. Liebigs Ann. Chem. 590,148 (1954)

3 BOURQUELOT,E. u. BERTRAND,C.R. hebd.Séances Acad. Sci. 121,783 (1895)

4 KURSSANOW,A.L. Synthese und Umwandlung der Gerbstoffe in der Teepflanze. Beiheft 1 zur "Pharmazie". Berlin: Volk und Gesundheit 1954.

5 HATHWAY,D.E. u. SEAKINS,J.W.T. J.chem.Soc. London 1957,1562

6 ROBERTS,E.A.H. J.Sci.Food Agric.9,381 (1958);
Chem.and Ind.1958,309;
Chem.and Ind.1957,1355.

7 KUBOWITZ,F. Biochem.Z.292,221 (1937);299,32 (1938)

8 JAKSON,H. Biochem.J.33,1452 (1932)

9 WAGREICH,H. u. NELSON,J.H. J.Amer.Chem.Soc.60,1545 (1938)

10 TRAUTNER,E.M. u. ROBERTS,E.A.H. The Chemical Mechanism of the Oxydative Desamination of Aminoacids by Catechol and Polyphenolase. Austral.J. Sci.Res.,Ser.B,3,356 (1956); zit. in (4).

11 ZLATAROFF,A. u. POPPOFF,I.D. Z. Unters. Lebensmittel 73,154 (1937)

12 KOZOI,Y. zit. in Z.Unters. Lebensmittel 27,209 (1914)

13 FLEISCHER,G. Pharmazie 11,248 (1956)

14 F.P. 51446 vom 21.3.1941; zit. C.113,II,2098 (1942)

15 BIEHL,B. (Dissertation,Hamburg,1958)

16 KUBOWITZ,F. Biochem.Z.292,221 (1957)
Biochem.Z.299,32 (1938)

17 GRAUBARD,M. u. NELSON,J.M. J.biol.Chemistry 111, 757 (1935); J.biol.Chemistry 112,135 (1935)

18 SCHUBERT,T.A. Das Phenolasesystem, seine Rolle bei der Atmung und Fermentation des Tees. Autoreferat kandidatskoj dissertatii Moskau, 1951,S.16; zit.(4)

19 HATHWAY,D.E. u. SEAKINS,J.W.T. J.chem.Soc. London 1957,1562; Nature, London,176,218 (1955)

20 HATHWAY,D.E. u. SEAKINS,J.W.T. Biochem.J.67,239 (1957)

21 METZNER,H. Die Ascorbinsäure in der Pflanzenzelle. Plasmatologia 2,B 2 b[illegible],Wien,Springer 1957

22 MILLER,H. u. DAWSON,C.R. J.Amer.chem.Soc.63,3375 (1941)

23 GOLJANITZKI,J.A. u. BRJUSCHKOWA,A.K. Über das Vitamin C (l-Ascorbinsäure) im Tee.Dokl.Akad.Nauk SSSR 4,(13) (1936),Nr.8; zit. in (4).

24 SOMMER,E. (Dissertation, Freie Universität Berlin, 1959)

25 NEUBERG,C. u. KOBEL,M. Naturwissenschaften 23,800 (1935)

26 ROBERTS,E.A.H. u. WOOD,D.J. Biochem.J.47,175 (1950)

27 MILLER,W.H. u. DAWSON,C.R. J.Am.chem.Soc.63,3368 (1941)

28 FRÖMMING,K.-H.Pharmaz.Ztg.105, 27 (1960)

29 LINDNER,M.W. Planta med. 4,80 (1956)

30 FRIEDRICH,H. Pharmaz.Zentralhalle Deutschland 95, 308 (1956)

31 THUNBERG,T.Skand.Arch.Physiol.73,199 (1936)

32 DAWSON.C.R. u. NELSON,J.M. J.Amer.chem.Soc.60, 245,250 (1938)

33 HERRMANN,K. Pharmazie 9,670 (1954)

34 MOSER,H. Pharmazie 3,433 (1948)

35 BRIESKORN,C.H. Pharmazie 2,489 (1947)

36 GORIS,A. Arch.Pharmaz.Ber.dtsch.pharmaz.Ges.18, 345 (1908)

37 GRAUBARD,M. u. NELSON,J.M. J.biol.Chemistry 111, 757 (1935)

38 BORDNER,C.A. u. NELSON,J.M. J.Amer.chem.Soc.61, 1507 (1939)

39 WALLER,C.W. u. GISVOLD,O. J.Amer.Phar.Ass.34, 78 (1945)

40 RUTH,E.F. zit.in Chem.Abstr. 1948,42,2326

41 BOTKIN,C.W. u. DUISBERG,P.C. zit.in Chem.Abstr. 1949,43,9174

Lebenslauf

Am 8. September 1932 wurde ich, Otfried Kurt Linde, in Sandersleben als Sohn des Justizinspektors Kurt Linde und seiner Ehefrau Dora, geb. Becker, geboren.
Ich besuchte von 1939 bis 1943 die Grundschule und von 1943 bis 1951 das Karls-Gymnasium in Bernburg. Im Juni 1951 legte ich mein Abitur ab und begann im August 1951 meine Praktikantenzeit in der Apotheke des Kreiskrankenhauses Bernburg; den zweiten Teil der Praktikantenzeit absolvierte ich in der Bär-Apotheke in Bernburg. Im April 1953 legte ich das Pharmazeutische Vorexamen in Halle ab, arbeitete noch sechs Monate als Assistent in der Apotheke des Kreiskrankenhauses Bernburg und begann im November 1953 das Pharmaziestudium an der Technischen Universität Berlin. Nach zwei Semestern setzte ich mein Studium am Pharmazeutischen Institut der Freien Universität Berlin fort und legte im Herbst 1956 das Pharmazeutische Staatsexamen ab. Als Kandidat der Pharmazie war ich in der Charlotten-Apotheke, Berlin Charlottenburg, tätig. Während dieser Zeit begann ich mit der Ausführung meiner Dissertation am Pharmazeutischen Institut der Freien Universität.
Nach Erteilung der Approbation im November 1957 besuchte ich neben der Assistententätigkeit als Famulus von

Herrn Prof.Dr.G. Schenck Vorlesungen und Übungen an der Wirtschafts- und Sozialwissenschaftlichen Fakultät der Freien Universität und am Deutschen Hochschulinstitut für Wirtschaftskunde.
Seit 1.10.1959 bin ich als wissenschaftlicher Assistent am Pharmazeutischen Institut der Freien Universität Berlin tätig.